

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平8-19001

(24) (44) 公告日 平成8年(1996)2月28日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 45/00

A 2 3 L 1/308

A 6 1 K 31/725

31/73

31/795

識別記号

ADN

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

請求項の数23(全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平2-506819

(86) (22) 出願日 平成2年(1990)4月20日

(65) 公表番号 特表平4-503813

(43) 公表日 平成4年(1992)7月9日

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 0 / 0 2 0 7 9

(87) 国際公開番号 W O 9 0 / 1 2 5 7 9

(87) 国際公開日 平成2年(1990)11月1日

(31) 優先権主張番号 3 4 0 8 6 8

(32) 優先日 1989年4月20日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 4 2 9 3 9 8

(32) 優先日 1989年10月31日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 999999999

ランジ, ルイス ジョージ ザ サード

アメリカ合衆国 ミズーリ 63112 セン

トルイス キングズベリー プレイス 38

(71) 出願人 999999999

スビルバーグ, カーティス エイ,

アメリカ合衆国 ミズーリ 63017 チェ

スターフィールド ウィロー リッジ レ

イン 2230

(72) 発明者 ランジ, ルイス ジョージ ザ サード

アメリカ合衆国 ミズーリ 63112 セン

トルイス キングズベリー プレイス 38

(74) 代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外1名)

審査官 鶴見 秀紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コレステロール吸収を抑制する薬剤、食物製品及び組成物

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】非被吸収性コレステロールエステラーゼ抑制剤を含有することを特徴とするコレステロールの腸管吸収を抑制する薬剤。

【請求項2】脾臓コレステロールエステラーゼを抑制するための合成非被吸収性硫酸化多糖類の有効量を含有することによりなるコレステロールの吸収を減少させるための請求項1記載の薬剤。

【請求項3】非被吸収性多糖類が3-硫酸化非被吸収性多糖類である請求項2記載の薬剤。

【請求項4】3-硫酸化非被吸収性多糖類が合成非被吸収性3-硫酸化アルギン酸、ペクチン、アミロペクチン、キチン、デキストラン、セルロース、寒天又はキトサンである請求項3記載の薬剤。

【請求項5】硫酸化したセルロース、寒天、アミロペク

2

チン、キチン、キトサン、ペクチン又はアルギン酸の有効量を含有することを特徴とするコレステロール吸収を減少させる薬剤。

【請求項6】硫酸デキストラン(分子量200000より大)の有効量を含有することを特徴とするコレステロール吸収を減少させる薬剤。

【請求項7】脾臓コレステロールエステラーゼを抑制するための分子量が20kDaより大きい合成非被吸収性硫酸化多糖類の有効抑制量を含有することを特徴とするコレステロールの吸収を減少させる薬剤。

【請求項8】合成非被吸収性コレステロールエステラーゼ抑制剤の有効量を含有することを特徴とするコレステロールの吸収を減少させる摂取可能な食物製品。

【請求項9】消化管中で脾臓コレステロールエステラーゼを抑制するために20kDaより大きい分子量を有する合

10

成非被吸収性3-硫酸化多糖類の有効量を含有する請求項8記載の摂取可能な食物製品。

【請求項10】合成非被吸収性3-硫酸化多糖類が合成非被吸収性3-硫酸化アルギン酸、ペクチン、アミロペクチン、キチン、デキストラン、セルロース、寒天又はキトサンである請求項8記載の摂取可能な食物製品。

【請求項11】消化管中で膵臓コレステロールエステラーゼを抑制するために有効量の合成非被吸収性3-硫酸化セルロース、ペクチン、アルギン酸、寒天、キチン、キトサン、アミロペクチン又はデキストランを含有することを特徴とするコレステロールの吸収を減少させる摂取可能な食物製品。

【請求項12】有効量の合成非被吸収性硫酸化多糖類を有効量の被吸収性コレステロール合成遮断剤と組合せて含有することを特徴とする血清コレステロールレベルを低下させる医薬組成物。

【請求項13】有効量の合成非被吸収性硫酸化多糖類を有効量のトリグリセリドリパーゼ抑制剤と組合せて含有することを特徴とする血清コレステロールレベルを低下させる医薬組成物。

【請求項14】有効量の合成非被吸収性硫酸化多糖類を有効量の脂肪アシルコレステロールO-アシルトランスフェラーゼ抑制剤と組合せて含有することを特徴とする血清コレステロールレベルを低下させる医薬組成物。

【請求項15】コレステロールエステラーゼに対する抗体の有効量を含有することよりなるコレステロールの吸収を減少させる請求項1記載の薬剤。

【請求項16】硫酸化イオウ交換樹脂の有効量を含有することよりなるコレステロールの吸収を減少させる請求項1記載の薬剤。

【請求項17】10000ダルトンより大きい分子量を有する3-硫酸化多糖類の有効抑制量を含有することを特徴とする膵臓コレステロールエステラーゼ阻止剤。

【請求項18】3-硫酸化多糖類が100000ダルトンより大きい分子量を有する請求項17記載の薬剤。

【請求項19】3-硫酸化多糖類が500000ダルトンより大きい分子量を有する請求項17記載の薬剤。

【請求項20】3-硫酸化多糖類が3-硫酸化アルギン酸、ペクチン、アミロペクチン、キチン、デキストラン、セルロース、寒天又はキトサンである請求項17記載の薬剤。

【請求項21】少なくとも1種の非被吸収性のコレステロールエステラーゼ抑制剤と少なくとも1種のトリグリセリドリパーゼとからなる、コレステロールの腸管吸収を抑制する摂取可能な組成物。

【請求項22】少なくとも1種の非被吸収性のコレステロールエステラーゼ抑制剤と少なくとも1種の脂肪アシルコレステロール-O-トランスフェラーゼの抑制剤とからなる、コレステロールの腸管吸収を抑制する摂取可能な組成物。

【請求項23】少なくとも1種の非被吸収性のコレステロールエステラーゼ抑制剤と少なくとも1種のコレステロール合成遮断剤とからなる、コレステロールの腸管吸収を抑制する摂取可能な組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は人の腸におけるコレステロール吸収を減少させるための方法に関し、特に膵臓のコレステロールエステラーゼが触媒する、天然に存在し、かつ摂取されるコレステロールエステルの加水分解を抑制する非被吸収性合成硫酸多糖類の経口投与によるコレステロール及び脂肪酸の経腸吸収を抑制又は減少させることに関する。本発明は(1)コレステロールエステルから誘導されたコレステロールが遊離コレステロールに較べて優先的に吸収されかつ(2)コレステロールエステラーゼが遊離コレステロールの吸収を高めるという我々の驚ろくべき発見により、コレステロールエステラーゼが従来思われていたより総合的な食物コレステロール吸収に対して寄与する重要なものであるという我々の発見を基礎とする。

このようにして、コレステロールエステラーゼ抑制の驚ろくべき有用性はコレステロールエステラーゼの強力な(5  $\mu$ Mより小さい $K_i$ )抑制剤に関する新しい必要性を示した。本発明は我々の発見と、コレステロール及び脂肪酸の経腸吸収の促進に関与する酵素である、人膵臓コレステロールエステラーゼの強力な抑制剤である非被吸収性、非減成性硫酸化多糖類の合成を基礎とする。この発明は同様にそのような薬剤は安定であり、ビスケットのような焼き菓子中に添加する時腸管に生物適用性であり、従つて食品中で投与可能であるという我々の観察にも基づく。同様にこの発明はコレステロールエステラーゼの強力な非被吸収性抑制剤の他のクラスのものはコレステロールエステラーゼに対する抗体であるということ为基础とする。

アテローム性動脈硬化症は米国における主要な死因となつており、かつ高血清コレステロール濃度は致命的なアテローム性動脈硬化症の危険の増大と関連している、JAMA、1985年、第235巻、第2094頁(NIH Consensus Panel Report)。1988年、NIHで専門家のコンセンサスパネルは多数の人々の健康にもつとも重要なことはコレステロールの減少であり、かつ最先端の療法の目標は、より少量のコレステロールを食べることにより、又はコレステロールレベルを減少するために腸管中で作用する薬剤を使用することにより、コレステロールの経腸吸収を減ずるべきであると述べている、Arch.Int.Med.、1988年、第148巻、第36頁(Consensus Full Report)。

しかしながら、誰も食物コレステロールエステルが重要であると思わなかつたし、又コレステロールエステラーゼを抑制することによつてコレステロールを減少せようとしなかつたし、こうして腸管からのコレステロール吸収を阻止する薬剤は現在存在しない。現在は、腸

管内でコレステロールを減少させるために作用する重要な薬剤はコレストリアミン (cholestyramine)、胆汁酸隔離剤である; “過脂肪血清治療用剤”、The AMA Drug Evaluations、第6改訂版、第903頁。この薬剤は腸管内で胆汁塩を結合し、生じた結合体を糞便中に排出する。胆汁酸は再吸収されないで、肝臓はより多くの胆汁酸を合成するために付加的なコレステロールを使用し、体中のステロイド濃度を効果的に低下させる。胆汁塩隔離剤はコレステロール低下に効果的であるが、これはめつたに15%より多くのコレステロールを減少せず、かつ患者にあまり認容性ではない。多量のこのイオン交換樹脂を摂取しなければならず(15g以上)、このことは味覚的にも腸機能にも攻撃的である。通常の副作用は便秘及び鼓腸である; JAMA、1985年、第253巻、第2095頁。

コレステロールエステラーゼは食事の後脾臓により分泌され、かつ摂取された食物コレステロールのエステルの加水分解に作用する。遊離コレステロールの吸収において役割は認められていないが、この酵素はコレステロールエステルから誘導されるコレステロールの吸収に関しては重要なものとして認められていた。酵素活性が脾液から除去されれば、コレステロールオレエートからのコレステロール吸収は全く生じない。コレステロールエステラーゼ活性が回復すると、コレステロールの吸収が生じる、Borja等著、1964年、AM. J. Physiol、第206巻、第223頁、Vahouny及びTreydwell著、1964年、Proc. J. Exp. Biol. 及び Med. 第116巻、第496頁。吸収される脂肪酸は1部コレステロールエステルから来るし、かつ脂肪酸はアテローム性動脈硬化に寄与するので、酵素コレステロールエステラーゼはアテローム性動脈硬化を2つの方法で補強するのであろう。

この情報及び腸からのコレステロール吸収減少の計略を目標としたNIHの報告にもかかわらず、人脾臓コレステロールエステラーゼの薬理学的阻止に関する研究は全く実行されていない。事実、ほんの少くしの研究のみが人酵素に焦点をあわせているにすぎず、最も大きな注目は他の哺乳動物の酵素(ラット、豚及び牛)に向けられた、Calame等著、1975年、Arch. Biochem. Biophys.、第168巻、第57頁; Van den Bosch等著、1973年、Biochem. Biophys. Acta、第286巻、第94頁、Monsen等著、1977年、Biochem. Biophys. Acta、第486巻、第103頁、Guy等著、1981年、Eur. J. Biochem.、第117巻、第457頁、Sutton等著、1986年、Biochem. Biophys. Res. Comm.、第134巻、第386頁、及びBorgstrom著、1988年、Biochem. Biophys. Acta、第962巻、第308頁、唯一の研究がコレステロールエステラーゼ抑制剤が動物におけるコレステロール吸収を減少させることができることを示した、Fernandez等著、1989年、Biochem. Biophys. Acta、第1001巻、第249頁。しかしながら、この薬剤は水溶性基質を必要とする他のコレステロールエステラーゼ活性の弱い抑制剤であ

り( $K_i$  100  $\mu$ M)、かつ他の報告書はそれがコレステロールエステラーゼを全く抑制しないということを主張している、Hadvary等著、1987年、Int. J. Obesity 第11巻、補遺2、21。更に、この薬剤は30%吸収されかつ代謝される。このようにして、飲食物からのコレステロールの総合的な吸収への寄与においてコレステロールエステルの重要性への正しい評価の欠乏がコレステロールエステラーゼの抑制剤の開発を妨げ、かつ非被吸収性抑制剤に関するどんな興味ของการ集中も得られなかつた。

このエステルの優先的な吸収に関する我々の発見及びコレステロールエステラーゼが遊離コレステロールの吸収を刺激することができるという予期しなかつた観察のために、今や人脾臓コレステロールエステラーゼの抑制剤、特に強力で( $K_i$ は5  $\mu$ Mより小さい)、非被吸収性で、かつ非減成性である抑制剤を開発することが著しく必要とされている。種々の硫酸化多糖類の薬理学が調査された。Cook及びCammarata、1963年、Arch. Int. Pharmacodyn. 第144巻、第1頁。特に硫酸化アミロペクチンは米国特許第4150110号明細書において抗潰瘍剤として教示されているが、コレステロールの吸収を減少させる、コレステロールエステラーゼ抑制剤としての性質は認められなかつた。低分子量の硫酸化デキストランは過脂肪血症の治療に使用するために、かつ経口投与される抗凝結剤として認められている、英国特許第953626号明細書、腸管からのその強調された吸収特性に関して開発されたこれらの低分子量の(7000~8000、7~8kDa)硫酸化デキストランは血流酵素、リボプロテインリパーゼを活性化することによつて、1800mg/日の投与量で血清コレステロールレベルを減ずることを示している(Goro等著、1987、J. Clin. Biochem. Nutr. 2:55)。しかしながら、コレステロールエステラーゼを抑制するための、又はコレステロール吸収を抑制するためのその弱い活性は認められなかつた。更に、これらは食品添加物として使用されなかつた。高分子量デキストランスルフェートはその吸収性の欠失及びそれに伴う血清リボプロテインリパーゼ活性化の欠落により発展から除外されていた。低分子量デキストランスルフェートはその吸収性のゆえに人における血液凝固システムの完全な状態に変化、長期使用において危険な副作用を引き起こす、日本の薬剤(Ethical Drugs、第10改訂版、1986年及びMDS Kowa錠剤、Kowa Co.、名古屋、日本に関する製品挿入書を参照。

#### 発明の要約

本発明は合成非被吸収性及び非減成化合物、及び脾臓コレステロールエステラーゼを抑制するための有効量で合成非被吸収成硫酸化多糖類を経口的に投与することにより、又はコレステロールエステラーゼへの抗体を投与することにより、今や吸収を仲介することにおいて必要とされているキー酵素であることが本発明により認められている、人脾臓コレステロールエステラーゼを抑制す

ることによりコレステロール及び脂肪酸の経腸吸収を減少させるための方法である。

#### 図面の説明

第1図は種々のアルギン酸の硫酸化誘導体の合成を示し、

第2図は種々の硫酸化アルギン酸によるコレステロールエステラーゼの抑制を示し、

第3図は種々の、かつ特定の環位で硫酸化されたキトサンの合成を示し、

第4a及びb図はそれぞれエステル化及び遊離コレステロールの細胞吸収の硫酸セルロースによる抑制を示す。

第5図はコレステロールオレエートを飼料とする兔に対する硫酸セルロースの効果を示す。

第6a図はコレステロール及びコレステリルオレエートの食物効果を示す。

第6b図は標識付けしたコレステロールオレエート食物及びコレステロール食物からの $C_{14}$ -コレステロールの血清回収を示す。

第6c図は標識付けコレステロール食物及びコレステロールからの三重水素含有コレステロールの血清回収を示す。

第7図はコレステロールエステルを飼料とする兔の血清コレステロールに関する硫酸セルロースの効果を示す。

#### 有利な実施態様の説明

本発明により、我々は血清コレステロールのレベルを減少させ、アテローム性動脈硬化の発生を減少させるために、腸からのコレステロール吸収を抑制する方法に関する確実な発見をした。従来、食物中でのコレステロールエステルの役割に関する理解の欠除がコレステロールエステラーゼ抑制剤の開発を妨げた。コレステロールエステルは吸収される全食物コレステロールのわずか10~15%であると考えられていた;Dietschy著、Intestinal Lipid Absorption in Physiology of the Gastrointestinal Tract, 第2巻、第1170頁、1981年、Raven Press社、N.Y.。当時、コレステロールエステルはあまり重要でないという一般的に受け入れられた論題のために、コレステロールエステルの腸からの吸収を抑制しようとする試みはあまりなされなかつた。

コレステロールエステラーゼの抑制剤を開発することへの抗しがたい必要性に導びく我々の驚ろくべき発見はコレステロールエステルの食物寄与が著しく重大である、ある食物においては45%に達する、ということである。過去の誤認の理由は、コレステロールエステルが遊離コレステロールに比べて優先的に、80%を上回って、吸収されるということである。更に、他の実験はコレステロールエステラーゼが遊離のコレステロールの吸収をも促進するということを示している。これら2つの新しい観察はコレステロールエステラーゼが全コレステロール吸収に著しく寄与していることを示す。この驚ろくべ

き結論のために、人脾臓コレステロールエステラーゼの抑制剤を開発する重大な必要性がある。こうして、この従来顧みられなかつた薬剤設計の目標は今や重要な研究課題である。

生体内での使用に不適である蛋白質群の非特異的共有結合変更の使用される反応性化合物、Lambardo等著、1982年、Biochem. Biophys. Acta第67巻、第74頁とは別に、人脾臓コレステロールエステラーゼの抑制剤は全く記載されていない。ラット脾臓コレステロールエステラーゼにより触媒された、コレステロールエステルの加水分解を抑制するためのテトラヒドロリブスタチン (Tetrahydrolipstatin) の能力は示されていない。この薬剤は52kDa人脾臓トリグリセリドリパーゼの強力な抑制剤であり ( $K_i$  0.1  $\mu$ M)、かつこれがコレステロールエステラーゼを抑制しないということが報告されている、Hoqan等著、1987年、Int. J. Obesity II、補遺、第3巻、第35~42頁及びHadvary等著、1987年、Int. J. Obesity II、補遺第2巻、第21頁。他の報告書はこの薬剤がラットからのコレステロールエステラーゼの弱い抑制剤である ( $K_i$  100  $\mu$ M) ことを報告している、Borgstrom、1988年、Biochem. Biophys. Acta、第962巻、第308頁。しかしながら、この研究において使用されたアツセイはコレステロールエステルのかわりに水溶性人工の比色定量用基質を用いて実施された。これらは非特異的基質であるので、ワーシントン酵素マニュアル、Worthington Corp. Lilian Decker出版、1977年、引き出された結果には問題がある。他の研究は同様に水溶性基質を用いる脾臓エステラーゼの抑制剤に関して報告している、オガワ等著、1987年、Chem. Pharm. Bull.、第35巻、第4130頁; オガワ等著、1986年、Chem. Pharm. Bull.、第34巻、第1118頁; オガワ等著、1987年、Chem. Pharm. Bull.、第35巻、第3276頁。どんなアツセイも、コレステロールオレエートの加水分解の抑制が生じるということを示すように行なわれていない。アツセイのエステラーゼ基質、メチルブチレート、N-アセチルチロシンエチルエステル及びN-トリシルアルギニンメチルエステルはトリブシン及びトリグリセリドリパーゼをも包含する多数の脾臓酵素によつて加水分解される。従つて、いずれのデータもコレステロールエステルの加水分解を触媒するコレステロールエステラーゼを抑制する能力を示していない。これらの薬剤はすべて小さい分子量で、かつ吸収される、オガワ等著、1986年、Chem. Pharm. Bull.、第34巻、第1118頁。コレステロールエステラーゼ抑制剤に関する他の報告書も水溶性基質を使用した、Sutton等著、1986年、Biochem. Biophys. Res. Comm.、第134巻、第386頁。我々の実験室における研究は報告されたボロン酸 (Boronic acid) 誘導体がコレステロールエステラーゼが触媒するコレステロールエステルの加水分解を抑制しないということを示した。トリグリセリドリパーゼは水溶性基質の加水分解のために分離した活性位を有し、これはリビド加

水分解位とは違い、Winkler等著、1990年、Nature、第343巻、第771頁、という最近の発見を考慮すると、水溶性基質の抑制剤がコレステロールエステル加水分解の抑制に関して教示するということは理解できない。エステラスチンはコレステロールエステラーゼ、リソソーム酸エステラーゼの細胞内形成を抑制するが、この酵素は分泌された膵臓酵素と同じではなく、かつエステラスチンは膵臓コレステロールエステラーゼの抑制剤としては認められていなかった、Morin等、1989年、Biochem.Biophys. Acta、第1004巻、第139頁。経口投与によつて達成されない高濃度(100 $\mu$ M)でのテトラヒドロリブスタチンの胃内注入は、コレステロールの源がコレステロールオレエートである場合ラット中へのコレステロール吸収を明らかに抑制することができる。しかしながら、これらの研究者は、この薬剤の濃度がリパーゼ抑制に関する $K_i$ を1000倍を越えてもトリグリセリドリパーゼの抑制を観察しなかつた。この薬剤は同様に30%吸収され、かつ代謝され、Fernandez等著、1989年、Biochem.Biophys. Acta、第1001巻、第249頁、潜在的毒性に導びく。結局、この結果はイン・ビット(in Vito)における前記コレステロールエステル加水分解の抑制の欠乏と矛盾し、こうしてこの薬剤は酵素抑制とは異なる機構により働いていると思われる。

コレステロールエステラーゼはヘパリンによつて刷子縁膜上の結合位から移される、Bosner等著、1988年、PNAS、85巻、第7438頁。従来技術においては、アテロイドのような天然に生じるヘパリン様化合物の経口投与は未知の機構によつて血清コレステロールを減少させることを教示している、Seethanathan等著、1975年、Mol. Cell Biochem. 第8巻、第177頁。10000~20000で変化する低分子量のヘパリンは被吸収性薬剤としても教示されている、Folkman等著、1983年、Science、第221巻、第719頁。硫酸ヘパリンのような天然に生じるヘパリンは高価であり、1kgあたり10,000ドルであり、コレステロールエステラーゼとの結合相互作用はわずかに $10^{-6}$ Mである。他の硫酸化多糖類である、天然に生じる硫酸コンドロイチンはコレステロールエステラーゼと相互作用しない、Bosner等著、1988年、PNAS 85、7438。ヘパリンのコレステロールエステラーゼとの相互作用の能力の欠乏は、これが高価であり吸収され、副作用を伴うので慢性疾患に関して人への使用が制限される。

本発明は、我々が定義する構造上の特徴を有する合成多糖類が(1)ヘパリンのような酵素を抑制する、我々が発見した天然に生じる化合物より明らかに強力である、非常に強力なコレステロールエステラーゼの抑制剤(米国特許出願第168424号明細書、1988年3月15日提出)であり、(2)腸から非被吸収であり、(3)安価(約100ドル/kg)であり、かつ(4)(1)及び(2)の効力において腸内酵素とのより連続して接触する、ということを示すことにより従来技術を越える特記すべき

改良を教示する。

本発明によれば、我々は人膵臓コレステロールエステラーゼの、非常に大きな硫酸化多糖類抑制剤(分子量(100000より大)の構造特徴に関する発見をし、我々はこれをアツセイとしてコレステロールオレエート加水分解活性を用いて均質に精製した。これはサブナノモル抑制定数を有する高い特異性の誘導体を供給する硫酸化多糖類の合成及び特性に関する発明をも包含する。これらの薬剤の多くは非哺乳動物及び非バクテリア多糖類から製造され、これはその大きなサイズにより多糖類を非被吸収性及び非減成性とし、こうしてより少ない副作用を伴う。より小さいサイズの薬剤に関しては、重合するか、又は不活性ポリマーに結合し、より有効なものにすることができる。これらの薬剤はコレステロールエステラーゼ(100kDa人膵臓酵素)により触媒される、天然に生じるコレステロールエステル、例えばコレステロールオレエート、パルミテート、リノレート、ステアレート及びアラキドネートの加水分解を抑制するためにも特異的である。これらの薬剤は人膵臓トリグリセリドリパーゼ(52kDa)を阻害しない。これらの薬剤は人膵臓コレステロールエステラーゼをその刷子縁膜上の結合位から追放することもできる、Bosner等著、1988年、PNAS、第85巻、第7438頁。こうして、これらの硫酸化多糖類は少なくとも2つの機構—コレステロールエステルの酵素的分解の抑制及び酵素を腸管細胞上のその結合位から追放によつて、コレステロールエステラーゼが促進するコレステロールの吸収を減少させるように働らく。更に、これらの薬剤は、テトラヒドロリブスタチンと異なり、動物に投与される有効量において脂肪便症を引き起こさない。

更に、我々のコレステロールエステラーゼの抑制剤はトリグリセリドリパーゼの抑制剤と共に投与することができる。多量の脂肪酸吸収がトリグリセリドリパーゼの作用を介して生じるので、その抑制は著しい脂肪便症に導びくであろう。低い度合のリパーゼ抑制はコレステロールエステラーゼ抑制剤の投与と組み合わせて脂肪酸吸収、アテローム性動脈硬化症の発生を減少させることができる。こうして副作用を最少にすることができる。

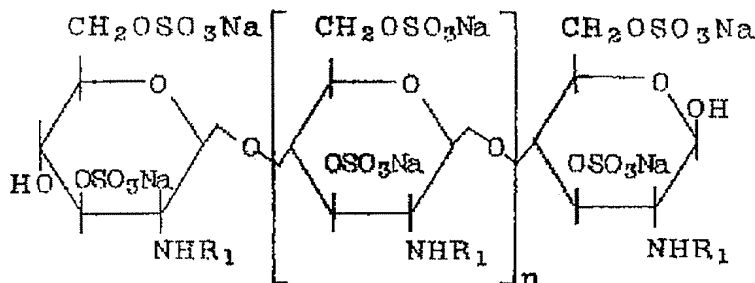
該分野の専門家は種々のトリグリセリドリパーゼ抑制剤、例えばアテローム動脈硬化症を減少させるために本発明の硫酸化多糖類抑制剤と組み合わせることのできる、例えばテトラヒドロリブスタチンを認識している。

低分子量硫酸化デキストラン(MDS-T)は日本において血清コレステロールレベルを減少させるために使用されている、ゴロー等著、1987年、J. Clin. Biochem. Nutr.、第2巻、第55~70頁。このバクテリアデキストランの分子量は7~8kDaの間である。この低分子量は炭素-14標識付け研究により示されるように、硫酸デキストランが腸において吸収されることを許す。(製品挿入書、Mxコーワ、コーワ社、名古屋、日本からの注射及び錠

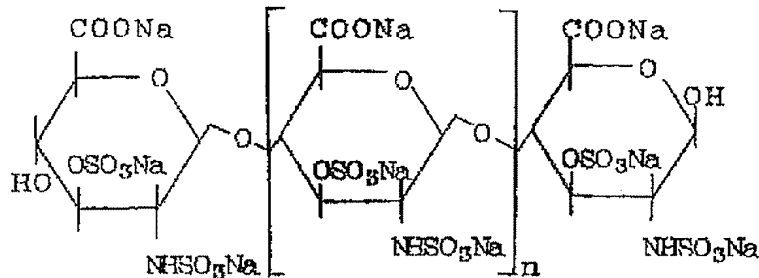
我々の研究は、天然に存在する種々の多糖類ポリマーを硫酸化し、人膵臓コレステロールエステラーゼの強力な水溶性抑制剤を製造することができることを示した。こうして、我々は種々の豊富で、かつ安い、水に不溶性の非被吸収性多糖類、例えばアルギン酸（海藻から、分子量240000）、ペクチン（野菜及びフルーツから、分子量200000）、キチン及びキトサン（軟体動物から分子量300000）、セルロース（植物及び木から、分子量500000）及び高分子量デキストラン（バクテリアから、分子量500000）を制御された方法で反応させて、すべて分子量が100000より大きい硫酸化誘導体を製造した。これらの誘導体はすべて腸管から非被吸収性である。これらは同様に人によつて非減成性である。硫酸化はこれらの多糖類を水溶性で、酵素に到達可能で、かつこうしてコレステロールエステラーゼの重要な抑制剤にし、この際出発材料はあまり水溶性でなく、かつ抑制作用を有していないか、又はあまり抑制作用を有していない。更に、硫酸化アミロペクチンはコレステロールエ

硫酸化多糖類のコレステロール吸収を低げることの効果は、腸管からの多糖類の吸収を下げ、こうしてその酵素との接触を長くすることにより増大する。高分子量硫酸化多糖類は非被吸収性であり、従つてコレステロールの吸収を抑制するために必要かつ十分である。増大する分子量は同様に多糖類の阻害活性を増大し、硫酸化は溶解性を増し、かつ酵素に接近し、より大きな抑制を生産する。例えば分子量5000 (5kDa) の硫酸デキストランは20nMのIC<sub>50</sub>で抑制し、一方分子量500,000 (500kDa) の硫酸デキストランのIC<sub>50</sub>は0.02nMであつた。

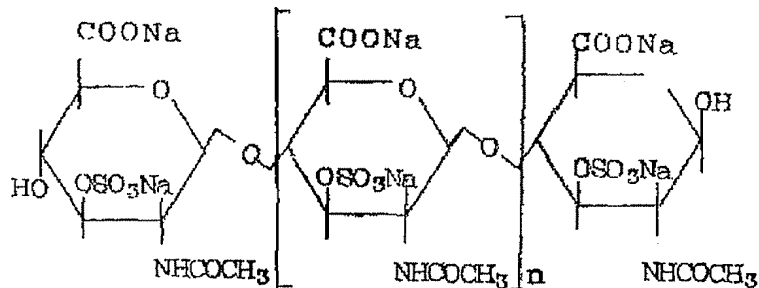
従つて、本発明は分子量20kDaより大の一般式：



〔式中、 $R_1$ は $\text{COCH}_3$ 又は $\text{SO}_3\text{Na}$ を表わす〕の化合物、分\* \*子量20kDaより大の



又は分子量、20kDaより大の



を包含する。

本質的に、我々の発見はしばしば不要なものとして認められる天然に生じる多糖類ポリマーを、少量で十分に認容性の量で可溶性薬剤として投与することのできる、一連の著しく強力で、安価で、非被吸収性で、かつ非毒性及び非減成性の、コレステロール及び脂肪酸の抑制剤に変換する実用的な方法に導びく。該分野の専門家はコレステロールエステラーゼとの接触を増大させるために抑制剤を腸管中で分散及び／又は強化又は延長するための方法がコレステロールの吸収を更に増大するというこ

とを認めている。これらの硫酸化多糖類は同様に動物臓器コレステロールエステラーゼの抑制剤でもある。例えば、硫酸セルロースは酵素の由来が牛 ( $K_i$  0.1  $\mu\text{M}$ )、豚、ラット又は兎の臓器である場合、コレステロールエステラーゼで触媒されるコレステロールオレートの加水分解を抑制する。コレステロールオレートを飼料とする兎へ硫酸セルロースを投与すると、コレステロール吸収が70%をう

わまわつて減少し、一方遊離コレステロールも同様に減少する。これらの抑制剤はACAT、脂肪アシルコレステロールオアシルトランスフェラーゼの抑制剤と組合わせて投与することもできる。これらの化合物は低級コレステロールであるが、吸収され、かつ不活性ではないので多くの毒性副作用を有する。副作用はその投与量を減らし、かつ吸収されないコレステロールエステラーゼ抑制剤と組み合わせて効果を保持することにより低くすることができる。

該分野における専門家は、例えばHeider等著、1983年、J. Lipid Res.、第24巻、第1127頁に記載されている

ような種々のACAT抑制剤をコレステロールの血清レベルを減少するために本発明の硫酸化多糖類と組合わせることができることを認める。

これらのコレステロールエステラーゼの硫酸化多糖類抑制剤は錠剤、カプセル、液剤及び粉末のような医薬投与剤形で投与することができる。同様に、これらはビスケットやクッキーのような食品製品に取り入れることもできる。本質的には、硫酸化多糖類をコレステロール及び脂肪酸吸収を、特に予期できない程大きな利点を得られるであろうコレステロールエステル豊富な食物から減少させるために食物追加物として使用することができる。食物及び医薬の分野の専門家は硫酸化多糖類を投与するための広く変化に富んだ形及び手段を認める。有利に、硫酸化多糖類は食物と共に、又はほぼ食物摂取の時間に、かつ特にコレステロールエステルが豊富な食物と共に投与される。

更に、これらのコレステロールエステラーゼの硫酸化多糖類抑制剤はコレステロール合成遮断剤と組合わせて投与することもできる。コレステロール合成遮断剤の治療を受ける患者は種々の毒性副作用を経験する。この毒性は患者に投与するコレステロール合成遮断剤の投与量を減少させることにより減少させることができる。従つて、腸管において吸収され、内生的なコレステロール合成を遮断する薬剤と組合わせて、本発明の硫酸化多糖類を投与すると、同じ最終的結果を得るためにコレステロール合成遮断剤の投与量の減少が許される。コレステロール合成遮断剤と関連する毒性を効果的に減少することができ、一方血清コレステロールレベルは減少したままである。

該分野の専門家は、コレステロールの血清レベルを減

小さくするために本発明の硫酸化多糖類と組合わせることのできる種々のコレステロール合成遮断剤、例えばロバスタチン (lovastatin) を承知している。

コレステロールエステラーゼの硫酸化非被吸収性抑制剤の関連した群は硫酸化イオン交換樹脂のグループであり、これらはモノ-S (ファルマシア社)、セファデックス-SP (シグマ社) 及びS-セファロース (ファルマシア社) のような不溶性のものである。これらの薬剤はすべてコレステロールエステラーゼと密に結合し、その機能を抑制する。

コレステロールエステラーゼの非被吸収性抑制剤の他の群は酵素に対して生じた、経口的に投与される抗体である。これらの抗体は胃のpHで、及びコレステロールエステラーゼへの結合において安定であり、彼らは酵素を抑制することにより吸収されるコレステロールの量を減少させる。該分野の専門家は乳やモノクローナル抗体を生産する種々の細胞中に抗体を分泌する牛のような種々の動物を含めて、そのような抗体の種々の生産法が存在することを認める。更に、そのような抗体の種々の調剤が腸内でのコレステロールエステラーゼとのその接触を強化するために製造されうる。

更に、次の実施例につき、本発明を説明するが、これらは、本発明の範囲及び思想をそこに記載の特定の方法に限定することを意図しているものではない。

#### 例1

マクロシステイス・ピリフエラ (Macrocystis Pyrifera (Kelp)) からのアルギン酸を、1mg/mlの濃度で水中に溶かした。この貯蔵溶液を、 $10^{-5}$  mg/mlまで低下する種々の他糖類濃縮物の製造のために使用した。ヒト脾臓コレステロールエステラーゼをボスネル (Bosner) 等の Proc. Nat. Acad. Sci. 85, 7438 (1988) に記載の方法で精製した。アルギン酸によるコレステロールエステラーゼ阻害を測定するために、コレステリンエステラーゼ (10 µg/ml) 50 µl、ホスファチジルコリンベシクルス (コレステリル<sup>14</sup>C-オレエート 1mM/2000CPM/nモルを含む) 75 µl、100mMタウロコレート 25 µl、150mMトリス (pH7.5) 120 µl 及び試験アルギン酸溶液 30 µl を37°Cで15分間恒温保持した。反応容器を4°Cの氷浴中に配置し、0.3N NaOH 0.6ml及びベンゼン/クロロホルム/メタノール (0.1/1.2/0.5) 3mlの添加により、この検定を静止させた (quenched)。この静止された反応物を30秒間渦動させ、3000gで15分間遠心し、上部水相の1mlを6N HCl 0.025mlを有するアクアソル (Aquasol) - 2 (DuPont) 7mlに添加した。この混合物を1分間渦動させ、<sup>14</sup>C-オレエートを計測した。この計測を、コレステロールエステラーゼを含有するがアルギン酸を含有しない試料と比較して、阻害率を測定した。

この検定法に従って、アルギン酸を $10^{-1}$  mg/ml $\sim$  $10^{-4}$  mg/mlの阻害に関して試験した。第1表に記載のように、この多糖類は、4 µg/ml又は20nM (分子量240kDaと仮

定) のIC<sub>50</sub>を有した。

#### 例2

アルギン酸の硫酸化は、種々の硫酸化 (sulfated) 誘導体の製造 (第1図) 及びそのコレステロールエステラーゼ阻害剤としての試験により示されているように、著るしくその阻害能力を高める。

#### 化合物2

アルギン酸ナトリウム (150mg) を、室温で、氷酢酸 (5cc) で2時間処理し、濾過しかつN,N-ジメチルホルムアミド (5ml) 中に再懸濁させた。この攪拌溶液に、室温で30分間にわたって三酸化硫黄-ビリジン複合体 (1.5g) を添加し、生じた混合物を1晩 (16時間) 攪拌した。次いで無水ビリジン (5ml) を添加し、硫酸化アルギン酸をアセトン-メタノール (9:1) 混合物100mlで沈殿させた。この沈殿をH<sub>2</sub>O (50ml) 中に溶かし、この溶液のpH値を1N NaOHでpH8に調節した。アセトン-メタノール (9:1) 混合物 (~200ml) での再沈殿により、硫酸化アルギン酸のナトリウム塩が得られた。この化合物を、前記のように、コレステロールエステラーゼ阻害に関して試験すると、これは、0.25 µg/ml又は1.0nMのIC<sub>50</sub>を有した (第1表及び第2図)。

#### 化合物5

アルギン酸ナトリウム (1g) を脱イオン水100ml中に溶かし、0.1M臭素溶液60mlを、攪拌しながら添加した。混合物を室温で24時間攪拌し、引き続き、この溶液のpH値を、1N NaOHで8.0に調節した。分子量3500のカット・オフ膜 (cut-off membrane) を用いて、48時間、水 (6 l × 4) に対する透析の後、溶液を凍結乾燥させると、酸化生成物 (第1表の化合物3) 810mgが得られた。

水中の化合物3 575mgに、酢酸アンモニウム8g及びシアノホウ水素化ナトリウム8gを、攪拌しながら添加した。この混合物のpH値を0.1N HClにより6.0に調節し、40°Cで48時間攪拌を続けた。混合物を室温まで冷却の後、この溶液のpH値を1N HClを用いて4.0に調節し、室温で更に2時間攪拌を続けた。この還元的アミノ化生成物を無水エチルアルコールの添加により沈殿させた。この沈殿を水 (200cc) 中に溶かし、2N NaOH溶液を用いてpH値を9に調節した。エチルアルコール-アセトン (1:1) 500ccでのこの溶液の処理により、ゼラチン様物質が得られたので、これを遠心により集めた。生じた混合物を無水アルコール及びアセトンで数回洗浄し、凍結乾燥させると、還元生成物 (第1表の化合物4) 532mgが得られた。

化合物4の硫酸化を、前記の方法 (化合物2参照) で、三酸化硫黄-ビリジン複合体を用いて行なつた。この硫酸化アルギン酸 (第1表の化合物5) を、コレステロールエステラーゼ阻害に関して試験すると、これは0.025 µg/ml又は0.10nMのIC<sub>50</sub>を有した (第1表及び第2図)。



## 化合物6

酸化されたアルギン酸 (500mg, 化合物3) を、氷酢酸 (25ml) で2時間処理し、残分を、DMF (25ml) 中に懸濁させ、三酸化硫黄-ビリジン複合体5gを30分かつて添加し、その間DMF溶液を4℃で攪拌した。反応混合物を放置して室温まで昇温させ、これを、更に24時間攪拌した。この反応混合物にビリジン (25ml) を加え、硫酸化生成物を、この溶剤混合物 (500cc) へのアセトン:メタノール (9:1) の添加により沈殿させた。残分を水60ml中に溶かし、これを、1N NaOH溶液を用いてこの溶液のpH値を8に調節することにより、ナトリウム塩に変えた。この溶液を、分子量3500のカット・オフ膜を用い、水 (4ℓ×6) に対して48時間にわたって透析させ、凍結乾燥させると、硫酸化アルギン酸 (第1表及び第2図の化合物6) 520mgが得られた。この化合物は、0.06μg/ml又は0.025nMのIC<sub>50</sub>でコレステロールエステラーゼを阻害した。

## 化合物7

文献 (Larm, O. Larsson, Scholander, E. Anderson, L. G., Holmes, E. 及び Sonderstrom, G., 1979, Carbohydrate Research 73:332) の記載に従って、硫酸化アルギン酸 (第1表の化合物7) を製造した。この化合物は、0.10μg/ml又は0.42nMのIC<sub>50</sub>で、コレステロールエステラーゼを阻害した。

アルギン酸のこの全ての硫酸化誘導体は、この天然と多糖類と比べて、優れた阻害剤である。これらの結果を、次表に挙げ、硫酸化が、阻害を20~200倍高めることを示す。

第1表

試料	IC <sub>50</sub> (nM)	増大係数
アルギン酸	20.0	1.0
化合物 2	1.0	20.0
化合物 5	0.10	200.0
化合物 6	0.25	80.0
化合物 7	0.42	48.0

## 例3

他の通常多糖類も、硫酸化されると、コレステロールエステラーゼの有効な阻害剤である。

ベクチン (2g) を氷酢酸で処理し、この多糖類をN,N-ジメチルホルムアミド (25ml) 中に再懸濁させ、攪拌懸濁液を氷浴で0℃に冷却することにより、硫酸化ベクチンを製造した。三酸化硫黄-ビリジン複合体 (10g, Aldrich) を添加し、溶液の温度を、室温に達成させた。更に3時間攪拌の後に、ビリジン (20ml) を加え、95%エチルアルコール (~300ml) で、この硫酸化多糖類を沈殿させた。この沈殿を水中に溶かし、1N水酸化ナトリウムでpH値を7.5に調節した。95%エタノールでの再沈殿により、硫酸ベクチンのナトリウム塩1.8gが得られた (測定値: C34.53; H4.54; O47.21; S0.77; Na8.31)。

この化合物をコレステロールエステラーゼ阻害に関し

て試験すると、これは、0.6μg/ml又は3.0nM (分子量200kDaと仮定) のIC<sub>50</sub>を有した。天然の硫黄化されていないベクチンは、コレステロールエステラーゼを阻害せず、有効な阻害を得るためには硫黄化が重要であることを示している。

生来のベクチンは、天然には、(1→4) 結合D-ポリガラクトノネート配列の部分メチルエステルとして生じる。このメチルエステルを、ベクチンエステラーゼでの処理により遊離酸に変えた。詳細には、ベクチン1gを0.1M NaCl 100ml中に溶かした。pHを7.5に調節し、ベクチンエステラーゼ (1.4mg, 250単位、シグマ) を添加した。0.1N水酸化ナトリウム溶液を用いて、この反応混合物のpH値を7.5に保持した。もはやpH値が変化しなくなつたら (約2時間)、溶液を透析管に移し、水 (4ℓ×4) に対して1晩透析させた。この透析された溶液の凍結乾燥により、加水分解されたベクチン820mgが得られた。メチルエステル分解生成物を、天然ベクチンに関する前記と同様な方法で硫酸化した。この硫酸化されたベクチンは、コレステロールエステラーゼを、0.04μg/ml又は0.2nMのIC<sub>50</sub>で阻害した。

キチン (他の天然由来多糖類) も、硫酸化のための潜在部位を有する。従って、キチン300mgを、室温で氷酢酸5mlで2時間処理し、不溶のキチンを集め、DMF 10ml中に再懸濁させた。三酸化硫黄-ビリジン複合体 (3g) を室温で添加し、この反応混合物を攪拌した。80時間後にビリジン5mlを添加し、溶液を更に30分間攪拌した。硫酸化キチンを95%エチルアルコール (100ml) の添加により沈殿させ、固体を水100cc中に懸濁させ、この溶液のpH値を、7.5に調節した。次いで、このキチン溶液を水に対して48時間透析させた。この溶液を濾過し、澄明な濾液を凍結乾燥させると、硫酸化キチン48mgが得られた。硫酸キチンは、ヒトコレステロールエステラーゼを、0.3nMのIC<sub>50</sub> (分子量300kDaと仮定) で阻害した。

キチンは、不溶であるので、キトサンを出発物質として用いて、硫酸化された物質の量を増大させた。キトサン (1g) を、室温で、氷酢酸20mlで2時間処理し、残分をN,N-ジメチルホルムアミド25ml中に懸濁させた。この攪拌溶液に、三酸化硫黄-ビリジン複合体 (10g) を室温で添加した。生じた混合物を2時間攪拌し、室温で72時間保持した。ビリジン (20ml) を添加し、硫酸化キトサンをアセトン-メタノール (9:1) で沈殿させた。次いで、これを水200ml中に溶かし、この溶液のpH値を2N水酸化ナトリウム溶液で7.5に調節した。95%エチルアルコールでの再沈殿により、硫酸キトサンのナトリウム塩を生じるから、これを水200ml中に再溶解させた。この多糖類溶液を水 (6ℓ×4) に対して48時間透析させ、次いで凍結させると、硫酸キトサンのナトリウム塩1.12gが得られた。コレステロールエステラーゼの阻害剤として試験する際に、これは、0.3nMのIC<sub>50</sub>を示した。

他の市場で入手しうる硫酸化多糖類も阻害能力に関して試験した。従つて、硫酸セルロース（分子量約500kDa）は、0.02nMのIC<sub>50</sub>を有し、硫酸デキストラン（分子量500000）も0.02nMのIC<sub>50</sub>を有した。低分子量の硫酸デキストラン（分子量5000）は、著るしく弱い20nMのIC<sub>50</sub>を有した。これらの全ての硫酸化化合物に関するIC<sub>50</sub>を次の第2表中にまとめる：

第 2 表

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)
硫酸ベクチン	3.0
硫酸ベクチン（加水分解された）	0.2
硫酸キチン	0.16
硫酸キトサン	0.16
硫酸セルロース	0.02
硫酸デキストラン（a）	0.02
硫酸デキストラン（b）	20.0

（a） 分子量500000の硫酸デキストラン

（b） 分子量5000の硫酸デキストラン

更に、以下の記載のようにして製造された硫酸アミロベクチンは、コレステロールエステラーゼの阻害剤としての作用をする。

機械的攪拌のための装置を備え、軟化（脱イオンされ、蒸溜された又は水道水も使用できる）1100部を含有するシヤケツト付き反応容器中に、シヤガイモデンプンから分別されたアミロベクチン275部を、攪拌しながら添加した。30分の攪拌の後に、25（w）% NaOH水少量宛で、pH値を約10.5〜11.0に調節した。温度は80° Fであった。

トリメチルアミン-三酸化硫黄複合体620部を1.5時間にわたつてゆつくり添加した。同時に、pH値を11.0に保持するように設計されたプログラム添加装置により25% NaOH溶液を更に導入した。このプログラム添加を全反応にわたつて保持した。

全てのトリメチルアミン-三酸化硫黄付加生成物の添加の後に、この容器を閉じ、反応の間に形成されたいくらかのトリメチルアミンの除去を開始するために12" 水柱の真空を施した。同時に、1.5時間にわたつて連続的に苛性アルカリの連続的プログラム添加により、温度を徐々に122° Fまで高めた。pH11.0を保持するようにプログラムされた苛性アルカリ添加を伴う122° Fでの11時間後に反応は完結した。

次いで、真空を27" 水銀柱まで高め、25% NaOH溶液のプログラム添加によりpHを11に保持しながら、ストリッピングによりトリメチルアミンを除去した。大体のトリメチルアミンが除去された後に、pHを約11に保持しながら、水1150部を用いて水ストリッピングを開始した。

遊離のトリメチルアミン含量が100ppm以下まで減少した後に、真空を解除し、固体を25（w）%の濃度に、pHを10.8〜11.0に調節した。次いで、生じた溶液を、連続的に、膜としてのパーチメントを用いて軟水に対して透

析させて、デンプン固体に対して5%のNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の塩含量にした。

この段階でのpH値は、約8であつた。次いで、生成物を、入口温度450° F、出口温度210° Fを用いてスプレー乾燥させた。

生じたスプレー乾燥された硫酸アミロベクチンは白色粉末状であり、未反応のトリメチルアミンの痕跡残分の存在から生じる臭い又は味がまったくなかつた。

## 例4

ここに記載の硫酸化多糖類も、ヒト100kDaコレステロールエステラーゼによるトリオレインの加水分解を阻害する（第1部に記載と同じ検定法を用いたが、コレステアシルオレエートの代りにトリオレインを使用した）。次の表に示されているように、トリオレイン加水分解の阻害に関するIC<sub>50</sub>は、コレステリルオレエート加水分解に関するそれとほぼ近似している。これらのデータは、これらの化合物が、脂肪の吸収を遮断する有用な薬剤であることを示しており、同様にコレステロールの吸収に関しても第3表に挙げる。

第 3 表

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)	
	トリオレイン	コレステリルオレエート
アルギン酸	42.0	20.0
化合物2	3.3	1.0
化合物5	0.25	0.10
化合物6	0.83	0.25
化合物7	0.42	0.42
硫酸ベクチン	2.5	3.0
ベクチン(加水分解された硫酸塩)	0.25	0.2
硫酸キチン	0.35	0.3
硫酸キトサン	0.85	0.3
硫酸セルロース	0.06	0.02
硫酸デキストラン*	0.08	0.02

\* 分子量 500000

## 例5

ここに記載の硫酸化多糖類は、高められた温度で、その阻害作用を長時間保持する。この特性は、それらを、焼成条件下で安定にし、その適用のための有利なベヒクルを提供する。例えば、硫酸セルロース109mgをコーン・マフィン・ミックス（Gold Medal）198g（7oz）に添加し、固体成分を十分に混合した。卵1個及びカツプ1/3のミルクの添加の後に、このマフィンミックスを15回攪拌した。この混合物を9個のマフィン容器中に入れ、400° のオーブン中で15分間焼いた。次の日に、1個のマフィンを粉碎し、水100mlを加え、15分間放置した。この混合物を遠心し、澄明上澄みをコレステロールエステラーゼ阻害の有無に関して検定した。この溶液のIC<sub>50</sub>

は、この溶液を $10^3 \sim 10^4$ 倍希釈の際に達成された。これらのデータは、この阻害剤が焼成条件下で安定であり、焼成された物質から溶液中に放出されうること示している。

## 例6

まず、市販の寒天2gを、N,N-ジメチルホルムアミド(25ml)中に懸濁させ、氷浴を用いて攪拌懸濁液を $0^\circ\text{C}$ に冷却することにより、市販寒天から硫酸化寒天を製造した。三酸化硫黄-ビリジン複合体(10g, Aldrich)を添加し、放置して、この溶液の温度を室温に達成せしめた。更に3時間攪拌の後に、ビリジン(20ml)を添加し、この硫酸化多糖類を95%エチルアルコール( $\sim 300\text{mI}$ )で、沈殿させた。この沈殿物を水中に溶かし、1N水酸化ナトリウムでpH値を7.5に調節した。95%エチルアルコールを用いる再沈殿により、硫酸化寒天が得られた。

ボスネル(Bosner)等のProc. Natl. Acad. Sci. 85, 7438 (1988)の記載に従つて、ヒト臍臓コレステロールエステラーゼを精製した。硫酸化寒天による臍臓コレステロールエステラーゼ阻害を測定するために、臍臓コレステロールエステラーゼ( $10\mu\text{g/ml}$ )  $50\mu\text{L}$ 、コレステリル $^{14}\text{C}$ -オレエート( $1\text{mM}$ , 2000CPM/nモル)を含有するホスファチジルコリンベシクル(vesicles)  $75\mu\text{L}$ 、 $10\text{mM}$ タウロコレート  $25\mu\text{L}$ 、 $150\text{mM}$ トリス(pH7.5)  $120\mu\text{L}$ 及び試験硫酸化寒天溶液  $30\mu\text{L}$ を $37^\circ\text{C}$ で15分間恒温保持した。反応容器を $4^\circ\text{C}$ 氷浴中に配置し、 $0.3\text{N}$  NaOH  $0.6\text{ml}$ 及びベンゼン/クロロホルム/メタノール(1.0/1.2/0.5)  $3\text{ml}$ の添加により、この検定を静止させた。静止された反応物を30秒間渦動させ、 $3000\text{g}$ で15分間遠心し、上部水相 $1\text{ml}$ を、エクアソール(Aquasol) - 2 (DuPont)  $7\text{ml}$ に、 $6\text{N}$  HCl  $0.025\text{ml}$ と共に添加した。この混合物を1分間渦動させ、 $^{14}\text{C}$ -オレエートに関して計測した。この計測値を、コレステロールエステラーゼを含有するが硫酸化寒天を含有しない試料と比較して、阻害率を測定した。

この検定法に従つて、硫酸化寒天は、ヒト臍臓コレステロールエステラーゼに対する $3.3 \times 10^{-11}\text{M}$ 又は $0.33\text{nM}$ (分子量 $300\text{kDa}$ に対して)の $\text{IC}_{50}$ を有することが測定された。

この $\text{IC}_{50}$ は天然(非硫酸化)寒天に関しては $3 \times 10^{-8}\text{M}$ 又は $30\text{nM}$ であることが測定された。この阻害は、寒天のアガロペクチンによる僅かな( $<0.1\%$ )汚染に依るらしく、寒天の硫酸化された形は、大抵の寒天の市販製品中に認められた。

## 例7

キトサンにより提示されたヒト臍臓コレステロールエステラーゼの潜在阻害( $0.3\text{nM}$ , 例III)に関する構造的基本を、多糖類環上の種々の位置で硫酸化された多数のキトサン誘導体の製造により測定した(第3図)。第4表に記載の要素を用いて5種の化合物を合成し、それら

の阻害活性を、前記の例6に記載の検定により測定した。5種の硫酸化された多糖類に関する構造活性関係を次にまとめた。

データが示しているように、3-スルフェートの存在は、ヒト臍臓コレステロールエステラーゼに対する、これら多糖類による阻害活性を得るために必要かつ充分である。しかしながら、2-位の硫酸化は、活性を低下し、6-硫酸化は不必要である。

第 4 表

化合物	硫酸化位置			
	2(a)	3(b)	6(b)	$\text{IC}_{50}\text{nM}$
I a	+	+	+	0.3
I a	—	+	+	0.3
II	+	+	—	1.6
III	+	—	—	N.I.
IV	—	+	—	0.3

(a) 2位がN-硫酸化

(b) 3又は6位はO-硫酸化

N.I. = 阻害なし

## 例8

結腸腺癌(Colonial adenocarcinoma)細胞(CaCo-2, ATCC)を、リボ蛋白質欠乏血清 $10(\text{v/v})\%$ を含有するデュルベツコ・モディファイド・イーグル培地(DuBecco's Modified Eagle's Medium)中の $25\text{mM}$ カバースリップ上で、 $2 \times 10^4$ 細胞の密度に生長させた。このカバースリップを燐酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、PBS  $1.0\text{ml}$ 、タウロコレート  $2\text{mM}$ 及び牛血清アルブミン $1\%$ を含有する $35\text{mm}$ ウェルに移した。次いでこの細胞を $37^\circ\text{C}$ で、 $^3\text{H}$ コレステロール $0.01\mu\text{Ci}$ 及び $^{14}\text{C}$ -コレステリルオレエート $0.01\mu\text{Ci}$ (これらは、ホスファチジルコリンベシクル中に埋封された)と共に恒温保持した。対照ウェルは、コレステロールエステラーゼを収容せず、実験セットは、牛 $72\text{kDa}$ コレステロールエステラーゼを収容した。種々の恒温保持時間で、カバースリップを取り出し、PBSで3回洗浄し、細胞をスクレーピングにより集め、SDS  $0.1\%$ を含有する $250\text{mM}$ トリスグリシン緩衝液(pH8.8)で洗浄する。細胞を遠心により集め、ペレットを $100^\circ\text{C}$ で5分間加熱し、次いで10分間音波処理をした。遊離ステロールから又はコレステリルオレエートからのコレステロールの吸収を、 $^3\text{H}$ 又は $^{14}\text{C}$ に関するシンチレーション計測により測定した。第4図に示されているように、コレステロールエステラーゼは、コレステリルオレエートから誘導されたコレステロールの吸収に触媒作用をし(第4a図)、これは、遊離コレステロールの吸収にも触媒作用をした(第4b図)。双方の場合に、硫酸セルロースは、著るしく細胞によるコレステロール吸収を阻害する(第4a図及び第4b図、口)。

## 例9

硫酸セルロースを用いて、遊離コレステロールから又

23

はコレステリルオレエートからのコレステロール吸収の阻害を生体内で試験した。6週間コレステリルオレエートを与えたウサギを12時間絶食させ、その胃内に経鼻胃腸管を挿入した。トリス緩衝液中の硫酸セルロース溶液(100mg/ml) 5mlを添加し、引続きホスファチジルコリンベシクル中に混入された<sup>3</sup>Hコレステロール20uCi10ml及び<sup>14</sup>Cコレステリルオレエートの20uCi10mlを添加した。次に、この経鼻胃腸管に付加的な硫酸セルロース溶液(100mg/ml) 5mlを流した。この管を取り除いた後に耳静脈から採血し、時間及び血漿100μℓの関数として、<sup>14</sup>C及び<sup>3</sup>Hに関して計測した。図から明らかなように、硫酸セルロースは、遊離コレステロール又はコレステロールオレエートから誘導されたコレステロールの双方の吸収を85%阻害する(第5図)。

## 例10

9匹のニュージーランド白ウサギ(2~2.5kg)を、通常のウサギ飼料で保持し、酵素的比色法(Wako Pure Chemical Industries, Limited)を用いて測定する際に、それらの血清コレステロールは21から66mg/dlに変動することが判明した。次いで、これらのウサギを、各3匹ずつの3群に分けた。1群に通常飼料を与え、第2群にコレステロール飼料(5g/kg、ステロール中0.5%)を与え、第3群にコレステリルオレエート飼料(8.66g/kg、ステロール中0.5%)を与えた。1週間間隔で、耳静脈から採血し(1.0~1.5ml)、10μℓ試料中の血清コレステロールを2回測定した。第6a図に示されているように、通常飼料のウサギは、5週間の試験期間にわたって血清コレステロールの変化を示さなかつた。他方、コレステロール飼料を与えたウサギは、同じ期間にわたって、その血清コレステロール値は35倍の増加を経験した。この増加は、コレステリルオレエートを与えたウサギではより顕著であつた(70倍)。これらのデータは、コレステリルエステルから誘導されたコレステロールが、遊離コレステロールよりも優先的に吸収されることを示している(第6a図)。

この優先的吸収を第2の方法で開示した。前記の3群の各々からの1匹のウサギを12時間絶食させた。この試験ウサギに経鼻胃腸管を挿入し、ホスファチジルコリンベシクル中に混入された<sup>3</sup>Hコレステロール20uCiの懸濁液を含有するトリス緩衝液10mlを添加した。これに引続き直ちに、同様な方法で<sup>14</sup>Cコレステリルオレエート20uCiの10mlを添加した。次いで耳静脈から採血し、血漿100μℓを<sup>14</sup>C及び<sup>3</sup>Hに関して計測した。図から明らかなように、放射能ラベルされたコレステリルオレエート(第6b図)又は放射能ラベルされたコレステロール(第6c図)は、コレステリルオレエートダイエットで保持されたウサギにおいて、優先的に吸収されている。

## 例11

ニュージーランド白ウサギ1匹を通常ウサギ飼料で保持した。実験開始の2日前に、動物に、硫酸セルロース

24

を最終濃度0.5%を示すように添加した飼料を与えた。次いで通常飼料で12時間後に、前記のように<sup>14</sup>Cコレステリルオレエートを適用して実験を開始した。次いで、常法で通常飼料を飲食させた。耳静脈から採血し、放射能ラベルされたコレステロールを、シンチレーション計測により測定した。第7図に示されているように、この実験過程にわたり、血清コレステロールの濃度は、対照ウサギのそれと比較する際に硫酸セルロースを与えたウサギにおいては50%低下した。更に、このラベルの適用後4時間までは、実験動物の血清中にコレステロールは現われなかつた。これとは対照的に、対照動物においては、その適用後僅かに2時間でラベルが現われる。例12

10mM NaCl、10mMトリス(pH7.2)中の市販の牛脾臓コレステロールエステラーゼを、同じ緩衝液で平衡化されたヘパリンセファロース(1.5×10cm)に施与した。更に、この樹脂を、100mMトリス(pH7.2)で洗浄することにより展開させると、全ての適用された蛋白質が実質的に溶離されても、これら優先的のいずれにおいても活性は殆んど又は全く認められなかつた。280nmにおける吸収が0になつたら、この樹脂を、先の緩衝液と同じ導電率を与えるのに充分な塩化ナトリウムを含有する20mMタウロコール酸ナトリウムで洗浄した。この全活性を数フラクション中に溶離させた。この1精製工程で、典型的に50~100倍の精製度で60~80%の収率を提供し、SDS-PAGE上で、67kDaで単一バンドを与える。

この均一な67kDa蛋白質500μgを、フロイドの完全アジユバント中で乳化させ、ニュージーランド白ウサギに皮下注射した。21日後に、10mM磷酸ナトリウム、150mM NaCl(pH7.1)の1ml中に溶かした蛋白質250μgの腹腔内注射で追加免疫させた。10日後に、このウサギから採血し、オクテルロニイプレート上で抗コレステロールIgGの存在を測定した。

この抗体の存在下に、ウシ72kDaコレステロールエステラーゼを検定した。典型的な検定において、コレステリル(<sup>14</sup>C)-オレエートベシクル75μℓ、稀釈された抗体25μℓ、100mMタウロレート25μℓ、150mMトリス(pH7.5)175μℓを試験管内で混合し、この反応混合物に、37°Cで酵素25μℓを添加することにより加水分解を開始させた。5分後に、0.3N NaOH600μℓ及びベンゼン/メタノール//クロロホルム(1/1.2/0.5)3mlの添加により、この反応を静止させた。混合の後に、この試料を、遠心し、澄明水相1mlを取り出し、放射能を計測した。対照活性は、添加抗体の不在下で測定した。この報告によれば、67kDaコレステロールエステラーゼに対する抗体を含有する血清は、ウシ72kDa酵素の潜在阻害剤であることが判明した。従つて、この血清の10<sup>3</sup>倍稀釈は、50%阻害を生じた。

前記のことから、説明の目的で、本発明の特定の態様がここに記載されているが、本発明の思想及び範囲を逸

10

20

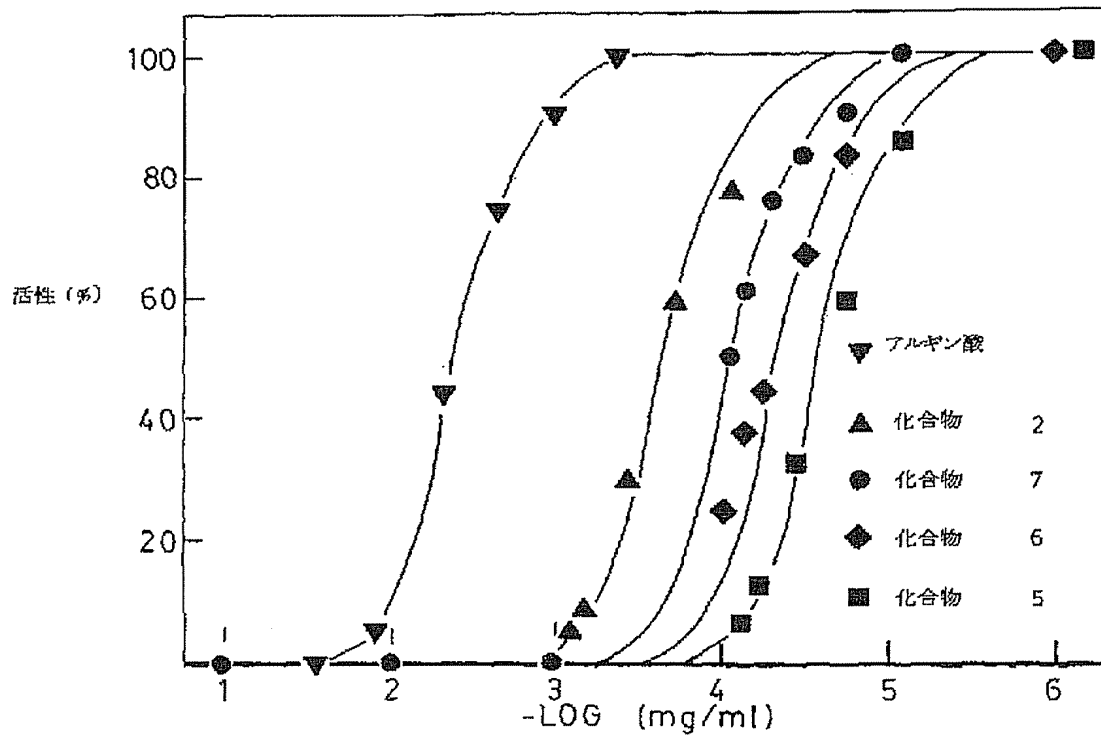
30

40

50

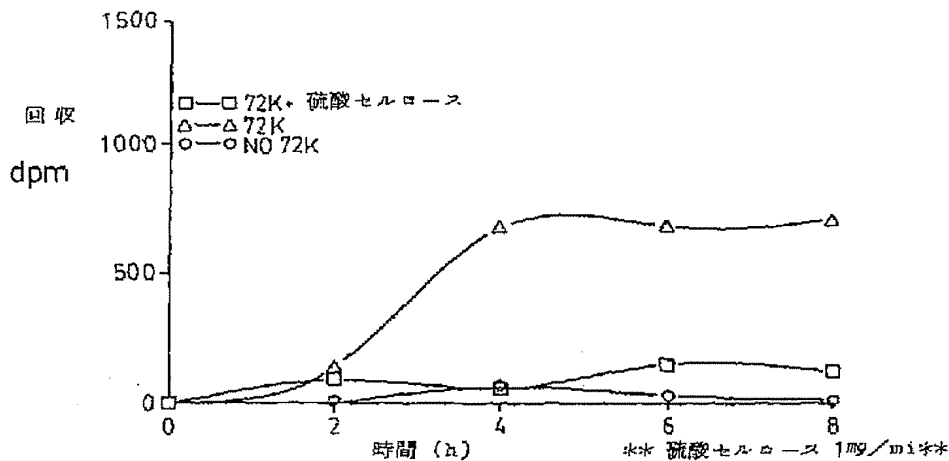
脱することなく、種々の変更が可能である。従つて、本 \*い。  
発明は、請求の範囲による以外は限定されるものではな\*

【第2図】



【第4a図】

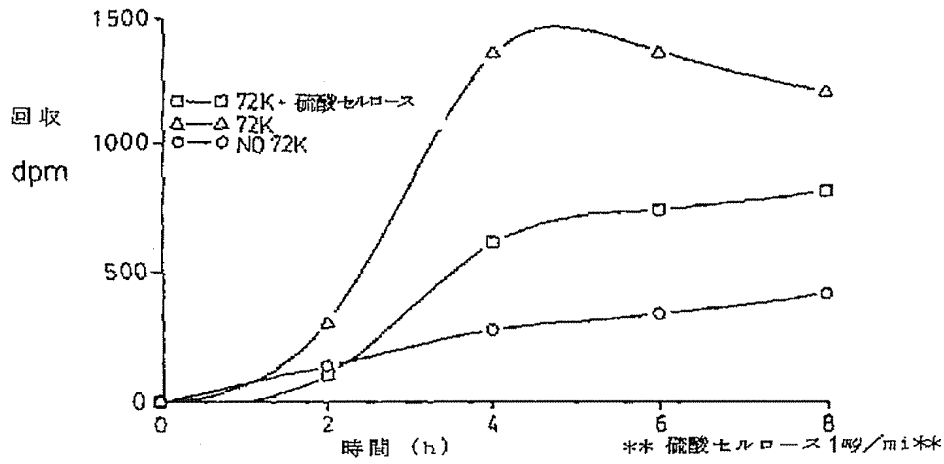
C-14 コレステロールオレエートからの  
コレステロールの  $\text{NaCO}_2$  細胞回収





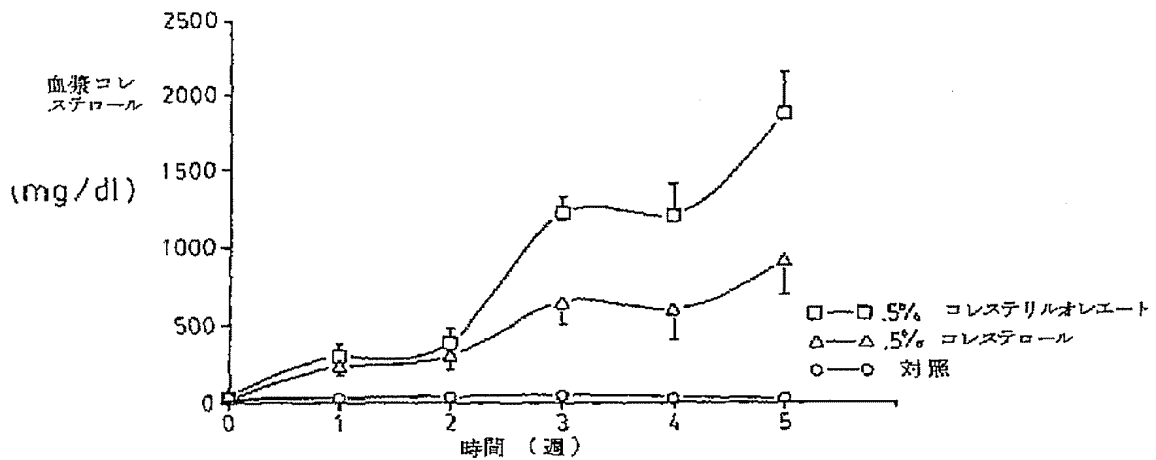
[illegible]

【第4b図】

三重水素含有コレステロールの $\text{CaCO}_2$ 細胞回収

【第6a図】

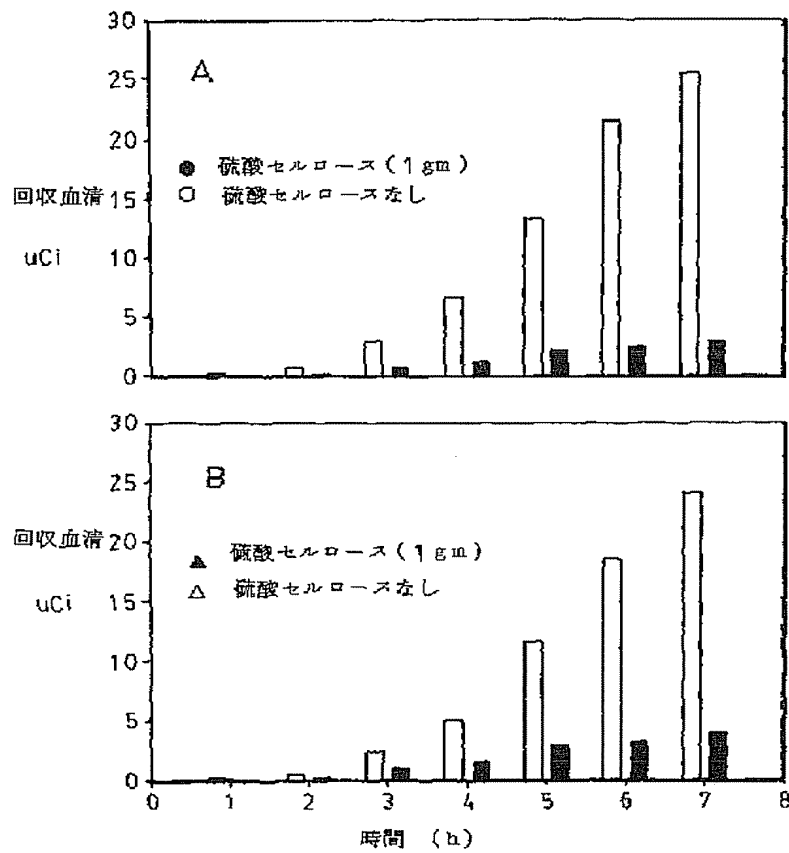
血清コレステロールにおけるダイエット効果



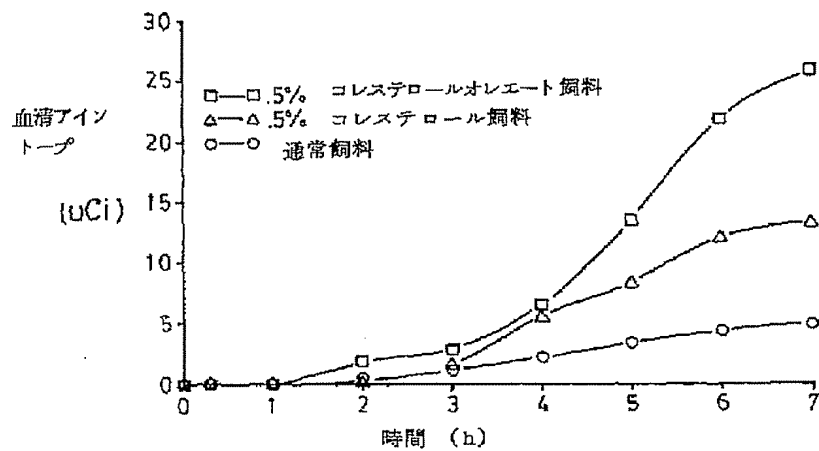


【第5図】

コレステロールオレエート飼育ウサギにおける遊離ヒ-  
3ステロール (A) 又は C-14 コレステロールオレエ-  
ート (B) からのコレステロールの回収

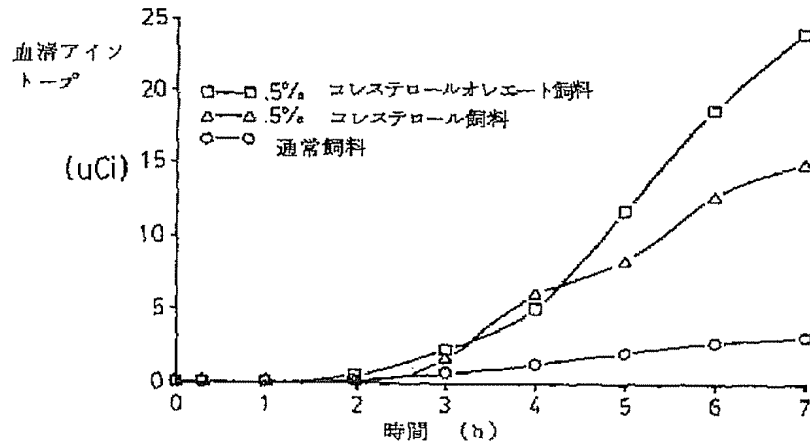


【第6b図】



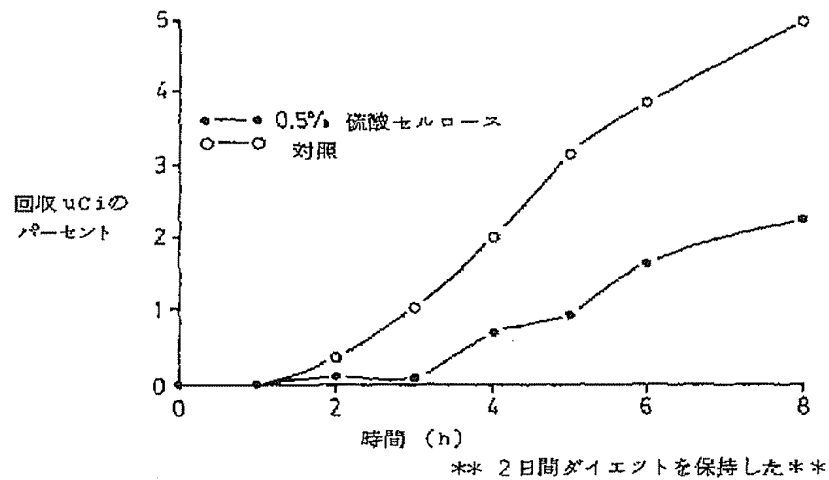
【第6図】

三重水素含有コレステロールの血清回収



【第7図】

0.5%硫酸セルロースダイエットの存在におけるコレステロールエステルからのラベルされたコレステロールの回収に関する比較



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A61K 39/395

// C12N 9/99

識別記号

庁内整理番号

D

F I

技術表示箇所

(72)発明者 スピルバーグ, カーティス エイ.  
アメリカ合衆国 ミズーリ 63017 チェ  
スターフィールド ウィロー リッジ レ  
イン 2230